

Wybrane doniesienia na temat aktualnej wiedzy o grupach krwi

(w świetle doniesień prezentowanych na 21. Regionalnym Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi [ISBT] w Lizbonie 18–22 czerwca 2011 roku)

Bogumiła Michalewska, Justyna Bednarz

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Odkrycie w 1900 roku układu grupowego ABO przez Karla Landsteinerja było jednym z najważniejszych wydarzeń medycznych XX wieku. W następnych latach odkrywano na powierzchni krwinek czerwonych nowe antygeny grupowe, których obecnie poznano już ponad 300. Wykrywanie i charakterystyka nowych antygenów opierały się całkowicie, aż do 1990 roku, na technikach serologicznych. Przez ponad wiek aglutynacja była „złotym standardem” we wszystkich jednostkach krwiodawstwa i krwiolecznictwa do określania antygenów i do badania zgodności biorcy z krwią dawcy. Obecnie zostały określone molekularne podstawy wszystkich polimorfizmów, a ich znajomość umożliwia przewidywanie fenotypów grup krwi na podstawie wyników badania DNA. Metodami biologii molekularnej w hodowli komórek organizmów prokariotycznych i eukariotycznych otrzymano wiele antygenów grupowych posiadających strukturę białka, tak zwane rekombinowane białka grup krwi.

Podczas sesji plenarnej profesor Seltsam z Niemiec wygłosił wykład o doświadczeniach swojego ośrodka i perspektywach zastosowania rekombinowanych antygenów do wykrywania i identyfikowania alloprzeciwciał w serologicznej diagnostyce grup krwi [1]. Podkreślił, że aby rekombinowane antygeny były sprawne w wykrywaniu słabych przeciwciał dominujące znaczenie ma zaprezentowanie ich w trójwymiarowej strukturze, w jakiej występują naturalnie. Trójwymiarową strukturę białek grup krwi określają takie czynniki jak: typ białka błonowego (np. czy przechodzi ono przez błonę raz czy wielokrotnie), typ modyfikacji białka po translacji

(np. glikozylacja, dwusiarczkowe wiązania) oraz typy wzajemnego oddziaływania z innymi białkami błonowymi. Techniczne rozwiązania i rodzaj testu, w którym będą użyte rekombinowane białka grupowe krwi w znacznym stopniu zależą od tego, czy białka antygenów są wbudowane w błonę krwinek czy występują jako rozpuszczalne cząsteczki. Aby rekombinowane białka, jako odpowiedniki tych antygenów, które w warunkach naturalnych wielokrotnie przebijają błonę krwinki (np. Rh, Kidd), mogły prawidłowo prezentować antygen, w projektowanym teście muszą być wyeksponowane w białkach błony krwinki. Białka błony krwinki czerwonej można otrzymać w hodowli na komórkach eukariotów. Wyprodukowany test z użyciem rekombinowanych antygenów musi wykazywać się zarówno odpowiednią czułością, jak i specyficzością. Wysoki poziom ekspresji białek grup krwi oraz odpowiednie unieruchomienie komórek lub fragmentów błony krwinki na powierzchni podłoża będzie miało zasadnicze znaczenie dla czułości metody. Specyficzność metody zależy natomiast głównie od tego, czy uda się uniknąć reakcji spowodowanych innymi przeciwciałami niż tymi, które są skierowane do antygenów grup krwi, w tym głównie przeciwciał HLA klasy I i nieswoistej dla antygenów grup krwi adsorpcji IgG na błonie krwinki.

Rozpuszczalne rekombinowane białka grup krwi mogą być wykorzystane w odczynnikach, stosowanych do testów opartych na hamowaniu aktywności przeciwciał, do testów w fazie stałej, na przykład ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) lub w technikach opartych na mikrochipach białkowych.

Adres do korespondencji: dr n. farm. Bogumiła Michalewska, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT, ul. Chocimska 5, 00–957 Warszawa, tel.: (22) 349 66 00 wew. 224, faks: (22) 349 66 11
e-mail: bmichalewska@ihit.waw.pl

Ostatnio zespół Seltsama opracował nowoczesny test do wykrywania alloprzeciwciał z zastosowaniem czerwonych polistyrenowych kulek opłaszczonych rekombinowanymi białkami grup krwi oraz sprzętu systemu ID Mikro Typing. Opłaszczony rekombinowanymi antygenami kulki nadają się również do badań cytometrią przepływową.

Nowy test może mieć zastosowanie w rutynowej diagnostyce wykrywania i identyfikowania swoistości przeciwciał dopiero wtedy, gdy pozwoli wykrywać znaczące klinicznie przeciwciała (po przetoczeniu krwi niszczą niezgodne antygenowo krwinki czerwone dawcy, a w przypadku konfliktu serologicznego niszczą krwinki płodu, który odziedziczył niezgodny antygen po ojcu), z czułością równą co najmniej czułości testów opartych na stosowaniu krwinek czerwonych. W dalszym ciągu jednak nie otrzymano rekombinowanych białek wszystkich znaczących klinicznie antygenów grup krwi lub uzyskano nie wystarczająco skuteczną ich ekspresję, tak jak w przypadku białek układu Rh.

Obiecujące wyniki z zastosowaniem rekombinowanych białek grup krwi osiągnięto już w przypadku identyfikowania przeciwciał skierowanych do antygenów o wysokiej częstości występowania (tzw. antygenów powszechnych). Jak wiadomo, wśród alloprzeciwciał do antygenów powszechnych występują przeciwciała znaczące klinicznie, ale znacznie częściej wykrywane są przeciwciała klinicznie nieznaczące. Wykrycie i rozróżnienie obu typów alloprzeciwciał polegać będzie na wyhamowaniu aktywności jednego z nich przez użycie dwóch tzw. koktajli z rozpuszczalnymi rekombinowanymi białkami grup krwi. Jeden z nich jest mieszaniną antygenów znaczących klinicznie (np. Kp^b , k , Yt^a , $Ge2$, LW^a), drugi zawiera mieszaninę antygenów klinicznie nieznaczących (np. Ch^a , Rg^a , $SC1$, JMH , Kn^a , McC^a , Cr^a). Jeśli wynik hamowania wskaże na obecność alloprzeciwciał o znaczeniu klinicznym, wówczas ich swoistość można będzie określić, stosując do hamowania odczynniki zawierające pojedyncze rekombinowane białko grup krwi. Taka metoda pozwoli również na wykrycie i identyfikację dodatkowej swoistości przeciwciał znaczących klinicznie, towarzyszącej alloprzeciwciałom skierowanym do powszechnego antygeny. Profesor Seltsam przedstawił wyniki badań uzyskane w jego laboratorium przy zastosowaniu metody hamowania aktywności przeciwciał przy użyciu koktajli rozpuszczalnych rekombinowanych antygenów do identyfikacji alloprzeciwciał na przykładzie surowicy zawierającej $anti-Kn^a + anti-Jk^a$. Jeśli zastosuje się selektywne usunięcie (hamowanie) nieznaczących klinicznie alloprzeciwciał $anti-Kn^a$ do antygeny powszechnego, wówczas

surowica po hamowaniu może być użyta do próby krzyżowej.

Seltsam zaznaczył, że dopóki nie będą otrzymane rekombinowane białka wszystkich klinicznie znaczących antygenów, dopóty te nowe technologie nie będą mogły zastąpić metod wykrywania i identyfikowania alloprzeciwciał przy użyciu krwinek czerwonych. Stały postęp wiedzy i możliwości technologicznych obserwowany w tej dziedzinie pozwoli w przyszłości na użycie pojedynczych rekombinowanych białek grup krwi do wprowadzenia nowych metod opartych na technice „jeden dołek jeden antygen”, czyli jednostopniowej identyfikacji przeciwciał. Procedura taka znacznie uprości i przyspieszy proces ustalania swoistości alloprzeciwciał, który na razie jest czasochłonny i wymaga znacznego wkładu pracy. W chwili obecnej testy z zastosowaniem rekombinowanych białek mogą być użyte tylko jako testy uzupełniające, chociaż znacznie usprawniają metody badania z użyciem krwinek czerwonych.

Niezwykle istotne, bo poszerzające wiedzę na temat grup krwi, były doniesienia o wykryciu nowych antygenów, których łącznie jest już 328.

Podczas Zjazdu przedstawiono doniesienia o czterech nowych antygenach krwinek czerwonych wykrytych w testach serologicznych oraz scharakteryzowanych metodami biologii molekularnej: antygen KETI w układzie grupowym Kell, antygen DOLG w układzie Dombrock, antygen RHAG4 w układzie RHAG i antygen PX2 w kolekcji GLOB.

Antygen KETI o wysokiej częstości występowania jest obecnie 32. antygenem w układzie Kell. Został zgłoszony przez Karamatic Crew i wsp. z Wielkiej Brytanii na podstawie wyników badań u chorego, u którego wykryto przeciwciała reagujące w PTA ze wszystkimi krwinkami nietraktowanymi i traktowanymi papainą oprócz dwóch przypadków krwinek K_0 i jednego przypadku krwinek KASH- [2]. Krwinki chorego wykazywały prawidłową ekspresję antygenów powszechnych z układu Kell (k , Kp^b , Js^b i $K11$). Po zsekwencjonowaniu genu *KEL* stwierdzono nową homozygotyczną mutację w eksonie 12 w pozycji 1391C > T kodującą zmianę aminokwasu Thr464Ile w glikoproteinie Kell. Mutacja była potwierdzona w PCR-RFLP.

Antygen PX2 został zgłoszony przez Olssona i wsp. ze Szwecji [3]. Autorzy zaobserwowali dodatnie wyniki prób krzyżowych u chorego o fenotypie P_1^k z krwinkami dawców pp. Jak wiadomo, krwinki pp nie posiadają antygenów P, P^k i P_1 (są tzw. krwinkami *null* w tych antygenach). Przeprowadzone badania testami aglutynacji z krwinkami nietraktowanymi i traktowanymi papainą wykazały, że słabo dodatnie/o zróżnicowanym nasileniu wyniki prób

krzyżowych osób P^k z krwinkami pp wynikają z obecności naturalnie występujących przeciwciał do antygeny, który może pojawiać się w większej ilości na krwinkach niektórych osób pp. Wyniki oznaczeń na poziomie molekularnym skłoniły autorów wystąpienia do wysunięcia hipotezy, że u osób o fenotypie P^k brak funkcjonalnej transferazy β3GalNAc na skutek mutacji genu *B3GALNT* odpowiada za brak dalszego przekształcenia paraglobozydu i utworzenia glikosfingolipidu x2. Autorzy proponują, aby antygen, którego obecność wykazano na krwinkach pp nazwać PX2 i tymczasowo włączyć do kolekcji GLOB.

Karamatic Crew i wsp. z Wielkiej Brytanii na podstawie dowodów uzyskanych w wyniku badań serologicznych i molekularnych zaprezentowali wykrycie nowego antygeny o wysokiej częstości występowania — DOLG, którego cechy zakwalifikowały go do układu grupowego Dombrock [4]. U kobiety ciężarnej, pochodzącej ze Sri Lanki, wykryto alloprzeciwciała reagujące w PTA ze wszystkimi krwinkami oprócz krwinek Gy(a-), które są krwinkami null w układzie Dombrock. Krwinki czerwone tej ciężarnej wykazywały prawidłową ekspresję antygenów Do^b, Jo^a, Hy + natomiast ekspresja antygeny Gy^a była znacznie obniżona. Sekwencjonowanie genu *DO*, kodującego antygeny Dombrock ujawniło nową homozygotyczną mutację 674T > A w eksonie 2. Mutacja kodowała zmianę aminokwasu Leu225Gln w glikoproteinie Dombrock; DOLG jest ósmym antygenem w układzie grupowym Dombrock. Kobieta z alloprzeciwciałami anti-DOLG urodziła dziecko z BTA-ujemnym i bez oznak choroby hemolitycznej płodu i noworodka.

O nowo odkrytym, czwartym już, antygenie w układzie RHAG poinformowali Poole i wsp. z Wielkiej Brytanii i Holandii [5]. Jest to pierwszy przypadek, w którym alloprzeciwciała skierowane do antygeny z układu RHAG miały znaczenie kliniczne. Zostały one wykryte u matki, która niedawno urodziła drugie dziecko z objawami ciężkiej choroby hemolitycznej, wymagające transfuzji wymiennej. U dziecka stwierdzono silnie dodatni BTA z anty-IgG. Fenotyp Rh matki był DccEe, ojca Dccee i dziecka: DccEe z osłabioną ekspresją antygeny e. Badanie przeglądowe w osoczu matki z krwinkami wzorcowymi było ujemne, ale osocze matki silnie reagowało z krwinkami ojca dziecka w PTA i w teście enzymatycznym (z krwinkami papainowanymi). W badaniach rodzinnych okazało się, że krwinki dwojga przyrodniego rodzeństwa męża były również silnie niezgodne z osoczem kobiety. W badaniach molekularnych ojca dziecka sekwencjonowano geny *RHD*, *RHCE* i *RHAG*. Nie znaleziono mutacji w genach *RHD* i *RHCE*, natomiast wykryto dwie ho-

mozygotyczne mutacje w eksonie 6 genu *RHAG*: 808G>A (*V270I*) i 861G>A, które nie zapowiadały zmiany aminokwasu. Obie mutacje w heterozygotycznej postaci znaleziono również u jego przyrodniego rodzeństwa, u pierwszego dziecka i u noworodka. We wniosku autorzy stwierdzili, że miejsca obu mutacji są zlokalizowane w przezbłonowym 9. regionie białka RhAG. Autorzy doniesienia przypuszczają, że mutacja V270I znaleziona w prezentowanej rodzinie powoduje ekspresję nowego epitopu i proponują, aby nowo odkryty antygen był nazwany RHAG4.

Bardzo ciekawe doniesienie o podstawach genetycznych polia glutynacji NOR wygłosiła Suchanowska reprezentująca zespół naukowców z Instytutu Immunologii i Terapii Eksperymentalnej we Wrocławiu [6]. Krwinki czerwone NOR zostały wykryte w Polsce jako drugi przypadek na świecie (pierwszy był w Stanach Zjednoczonych). Wykazują one polia glutynację, czyli są aglutynowane przez wszystkie ludzkie surowice/osocze, zgodne w grupie ABO i nie zawierające nieregularnych alloprzeciwciał do krwinek czerwonych. Jak już wcześniej wykazał zespół wrocławski, krwinki NOR posiadają glikosfingolipidy zawierające sekwencję Galα1>4GalNAc, która jako końcowa zewnętrzna jednostka glikolipidu na powierzchni erythrocytu jest rozpoznawana przez naturalnie występujące przeciwciała obecne powszechnie w ludzkich surowicach. U 14 osób NOR dodatnich stwierdzono heterozygotyczną mutację C631>G w genie *A4GALT* kodującym enzym — transferazę P^k, który katalizuje syntezę antygeny P^k. Mutacja C>G powoduje zmianę w aminokwasie Q211>E w łańcuchu polipeptydu transferazy P^k. W obecnej prezentacji przedstawiono wyniki badań, jakie otrzymano w hodowli komórek 2102Ep (linia ludzkich embrionalnych komórek rakowych, najbardziej zbliżona do niezróżnicowanych embrionalnych komórek), do których wprowadzono prawidłowy gen *A4GALT* dla transferazy P^k i gen z mutacją C631>G. Stwierdzono, że komórki z genem prawidłowym *A4GALT* wykazywały ekspresję antygeny P^k, natomiast nie wykazywały ekspresji NOR. Komórki z wprowadzonym zmutowanym C631>G genem wykazywały ekspresję zarówno antygeny P^k, jak i NOR. We wniosku autorka stwierdziła, że zamiana aminokwasu Q211E w transferazie P^k powoduje, że enzym nabiera zdolności do udziału w syntezie obu struktur; jednej z nich występującej w antygenie P^k (Galα1>4Gal) i drugiej w NOR (Galα1>4GalNAc).

Nasz Zakład (IHiT) przedstawił 4 doniesienia związane z immunohematologią krwinek czerwonych, z których dwa będą w tym sprawozdaniu omó-

wione. Orzińska i wsp. z IHiT oraz z 4 RCKiK zaprezentowali zastosowanie autorskiej metody do poszukiwania genu *RHD* u dawców oznaczonych w RCKiK jako RhD ujemni [7]. Metoda polegała na badaniu DNA, izolowanego z puli osocza od 96 dawców, metodą *real-time* PCR (*polymerase chain reaction*) dla eksonów 7. i 10. oraz intronu 4. genu *RHD*. U dawcy, u którego wykryto gen *RHD*, określano genotyp D słaby i kategorię D częściowego techniką SSP-PCR. Badaniami serologicznymi określano u tych dawców kategorię D częściowego lub, jeśli nie wykrywano antygeny D w testach aglutynacji, wykonywano adsorpcję/elucję w celu wykrycia antygeny DEL. Spośród przebadanych 16 608 RhD ujemnych dawców u 29 (0,18%) wykryto gen *RHD* (najczęściej hybrydę *RHD-CE(2-9)-D*, ale również *RHD* słaby typu 15, typu 11, typu 2, i typu 3, mutant *RHD* IV3-1G>A. U 3 dawców stwierdzono serologicznie obecność antygeny DEL. Autorzy stwierdzili, że przeprowadzone będzie sekwencjonowanie wykrytych fragmentów genów, aby scharakteryzować występowanie alleli genu *RHD* słabych odmian antygeny D w Polsce.

Michalewska, Olsson wraz z zespołami ze Szwecji, RCKiK Łódź i IHiT donieśli o wykryciu nowych mutacji genu *FUT1* odpowiedzialnych za niezwykle rzadki w świecie fenotyp Bombay (O_h) [8]. Grupa krwi O_h została wykryta w Polsce u 2 niespokrewnionych krwiodawców. Charakteryzuje się zupełnym brakiem antygenów A, B i H oraz obecnością w surowicy alloprzeciwciał anti-A, anti-B i anti-H. Gen *FUT1* koduje 2- α -fukozylotransferasę syntetyzującą antygen H na przykład na krwinkach czerwonych, który z kolei jest prekursorem dla syntetyzowania antygenów A lub/i B odpowiednio przez GalNAc-transferazę i Gal-transferazę, kodowane przez allele genu ABO. Fenotyp O_h powstaje w wyniku homozygotycznych mutacji inaktywujących gen *FUT1* i gen *FUT2*, którego ekspresja jest niezbędna dla obecności antygenów A, B i H w osoczu. Stosując w badaniach molekularnych metody PCR-ASP (*polymerase chain reaction-allele specific oligonucleotide*) i RCR-RFLP (*polymerase*

chain reaction-restriction fragment length polymorphism), wykryto u polskich dawców O_h dwie nowe mutacje w genie *FUT1*, które spowodowały utratę aktywności transferazy H. U jednego z dawców stwierdzono mutację 958G>A (Gly320Arg), u drugiego natomiast mutacja 1A>C (Met1Leu) jest pierwszym przypadkiem zmiany, która dotknęła, jak się oczekuje, zainicjowania syntezy białka — enzymu 2- α -fukozylotransferazy. Analiza *FUT2* wykazała u obu dawców homozygotyczną mutację 428G>A, kodującą zmianę Trp143Stop, występującą w rasie kaukaskiej u niewydzielaczy substancji grupowych.

Z przedstawionych w niniejszym sprawozdaniu doniesień wynika, a dotyczy to większości prezentowanych na Zjeździe prac, że rozwiązywanie zagadnień serologicznych w grupach krwi opiera się obecnie na metodach biologii molekularnej.

Piśmiennictwo:

1. Seltsam A. Application of recombinant antigens to blood group diagnostics. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 13–16.
2. Karamatic Crew V., Poole J., Bullock T., Regan P., Burton N., Daniels G. KET1, a novel high incidence antigen in the Kell blood group system: a serological and molecular study. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 19–20.
3. Olsson M.L., Peyrard T., Hult A.K., Hellberg A., Nilsson Sojka B., Norda R., Auvinen M.-K., Storry J.R. PX2: A new blood group antigen with implications for transfusion recommendations in P_1^f and P_2^f individuals. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 53.
4. Karamatic Crew V., Poole J., Marais I., Needs M., Wiles D., Daniels G. DOLG, a novel high incidence antigen in the Dombrock blood group system. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 263.
5. Poole J., Grimsley S., Ligthart P., de Haas M., de Vooght K., Bullock T., Daniels G. A novel RHAG blood group antigen associated with severe HDFN. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 70.
6. Suchanowska A., Czerwinski M., Laskowska A. i wsp. Genetic background of NOR polyagglutination. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 20.
7. Orzińska A., Bednarz J., Guz K. i wsp. RHD variants in Polish blood donors typed in the routine as RhD negative. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 264.
8. Michalewska B., Olsson M.L., Naremska G., Hult A., Ozog A., Brojer E. New *FUT1* mutations responsible for the H-deficient Bombay phenotype: the first example of an abolished start codon. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 263–264.